DOI:10.11931/guihaia.gxzw202410032

秋石斛 *LCYB*、*LCYE* 基因克隆和表达分析及其与花色的关系

陈曼曼[1,2]，罗小燕[2]，李亚梅[2]，李崇晖[2*]

（1．海南大学 热带农林学院，海口 570228；2．中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所，农业部华南作物基因资源与种质创制重点实验室，海南省热带作物资源遗传改良与创新重点实验室，海南省热带观赏植物种质创新利用工程技术研究中心，海口 571101）

摘　要：类胡萝卜素是秋石斛重要的花色素之一，秋石斛花朵中类胡萝卜素生物合成过程未见报道。因此，该文以黄花秋石斛品种‘金童’花芽为材料，克隆了类胡萝卜素合成途径下游分支上的两个关键合成酶基因 *DhLCYB*、*DhLCYE*，对其进行序列分析。利用 RT-qPCR 测定了其在不同花色秋石斛品种花发育不同阶段的表达特征，并利用靶向代谢组学技术研究了其中类胡萝卜素组成及含量且分析了色素组成和含量与花色及基因表达之间的相关性。结果表明：（1）克隆到了 *DhLCYB* 和 *DhLCYE* 基因的转录本，它们编码的氨基酸序列与同属的铁皮石斛、鼓槌石斛同源蛋白一致性最高。作为番茄红素的两个环化酶，DhLCYB 和 DhLCYE 在蛋白质三维结构上十分相似。（2）*DhLCYB* 和 *DhLCYE* 在不同秋石斛品种花发育不同阶段表达特征各异，*DhLCYE* 在黄色花中表达量比紫红色花高且与叶黄素和*α*-胡萝卜素含量显著正相关。*DhLCYB* 在不同花色品种中表达没有明显的规律，但其在 S1 时期的表达量与花药黄质、紫黄质等 LCYB 催化分支途径的*β*, *β*-类胡萝卜素类代谢物显著正相关。（3）从秋石斛花中共鉴定出 48 种类胡萝卜素，胡萝卜素类 4 种，叶黄素类 44 种；总类胡萝卜素含量在黄色品种中高于紫红色品种。（4）15 种类胡萝卜素及其衍生物、总类胡萝卜素含量与花色的色相 a^*显著负相关，与 b^*值显著正相关。本研究为秋石斛花色改良提供了基因资源和育种思路。

关键词：番茄红素*β*-环化酶，番茄红素*ε*-环化酶，基因克隆，表达量分析，花色，类胡萝卜素

中图分类号：Q943　　　　**文献标识码**：A

Cloning and expression analysis of *LCYB* and *LCYE* genes in *Dendrobium* hybrids and their relationship with flower color

CHEN Manman[1,2], LUO Xiaoyan[2], LI Yamei[2], LI Chonghui[2*]

(1. *College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University*, Haikou 570228, China; 2. *Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Tropical Crop Germplasm Research Institute, Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Ministry of Agriculture, Key Laboratory of Tropical Crops Germplasm Resources Genetic Improvement and Innovation of Hainan Province, The Engineering Technology Research Center of Tropical Ornamental Plant Germplasm Innovation and Utilization*, Haikou 571101, China)

基金项目：海南省科技人才创新项目（KJRC2023C19）；中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1630032022002)。

第一作者：陈曼曼 (2001—)，硕士研究生，研究方向为观赏园艺学，（E-mail）2713547954@qq.com。

[*]**通信作者**：李崇晖，博士，研究员，研究方向为热带花卉观赏性状形成和调控机制，lichonghui@catas.cn。

Abstract: Carotenoids is one of the important anthocyanins in phalaenopsis-type *Dendrobium* hybrids (Den-Phals), and the biosynthesis of carotenoids in Den-Phals flowers has not been investigated. Two key synthase genes *DhLCYB* and *DhLCYE* on the downstream branch of carotenoid synthesis pathway were cloned from the flower buds of Den-Phals cultivar *D.* Thongchai Gold, and their sequences were analyzed. We measured their expression characteristics at different stages of flower development in Den-Phals with different flower colors using RT-qPCR, and analyzed their correlation with the composition and content of carotenoids, which were investigated through targeted metabolomics assay. The results indicated that: (1) one transcript of *DhLCYB*, and one transcript of *DhLCYE* were cloned. Their amino acid sequences are closest to those of species of the same genus, *D. candidum* and *D. chrysotoxum*, showed the highest homology. As two lycopene cyclase enzymes, DhLCYB and DhLCYE showed highly similar in protein 3D structure. (2) *DhLCYB* and *DhLCYE* had different expression characteristics at different stages of flowering in Den-Phals. *DhLCYE* had a higher expression level in yellow flowers than that in purple-red flowers, and was significantly positively correlated with the content of lutein and *α*-carotene. There is no regular pattern in the expression of *DhLCYB* in various cultivars with different colors, but its expression level during the S1 stage was significantly positively correlated with the *β*, *β*- carotenoid metabolites of LCYB catalytic branching pathways such as antheraxanthin and violaxanthin. (3) there were total 48 kinds of carotenoids, including 4 carotenes and 44 xanthophylls, were identified from the flowers of Den-Phals; the total carotenoid content was higher in yellow cultivars than that in purple or pink ones. (4) The content of 15 kinds of carotenoids and their derivatives, as well as total carotenoids, was significantly negatively correlated with the chroma a^* and significantly positively correlated with b^* value. This study provides genetic resources and breeding ideas for color improvement of Den-Phals.
Keywords: lycopene *β*-cyclase, lycopene *ε*-cyclase, gene cloning, expression level analysis, floral colors, carotenoids

类胡萝卜素（carotenoids）是由异戊二烯骨架构成的 C_{40} 或 C_{30} 萜类化合物，植物花、叶、根、果皮等部位广泛存在类胡萝卜素（戴思兰等，2013）。类胡萝卜素种类与含量的不同，从而呈现出不同程度的黄、橙、红等颜色（Kishimoto et al.，2004），因其观赏性和营养价值，近年在园艺植物研究中备受关注（Hermanns et al., 2020）。

在类胡萝卜素生物合成途径中，类胡萝卜素最初来源于两个异戊二烯异构体，包括异戊二烯焦磷酸（isopentenyl diphosphate，IPP）和二甲基丙烯基二磷酸（dimethylallyl diphosphate，DMAPP），其主要通过甲基赤藓糖磷酸（2-*C*-methyl-*D*-erythritol 4-phosphate, MEP）途径合成。随后，在 IPP 异构酶（isopentenyl diphosphate isomerase, IPI）和牻牛儿牻牛儿基焦磷酸合酶（geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPPS）的作用下，1 分子 DMAPP 与 3 分子 IPP 缩合成 C_{20} 的牻牛儿牻牛儿基焦磷酸（geranylgeranyl diphosphate, GGPP）（陆晨飞等，2022）。两个 GGPP 分子由八氢番茄红素合酶（PSY）缩合产生 C_{40} 八氢番茄红素是类胡萝卜素生物合成途径中的第 1 个关键步骤（何静娟和范燕萍，2022）。而番茄红素*β*-环化酶（LCYB）和番茄红素*ε*–环化酶（LCYE）是控制下游类胡萝卜素合成分支的关键酶。

在 LCYB 的催化下，番茄红素两个末端均形成了*β*环，生成了*β*–胡萝卜素。其在*β*–胡萝卜素羟化酶（*β*-carotene hydrolase, BCH）的催化下依次转变为*β*–隐黄质（*β*-cryptoxanthin）和玉米黄质（zeaxanthin）。后者在玉米黄质环氧化酶（zeaxanthin epoxidase, ZEP）的作用下依次合成花药黄质（antheraxanthin）和紫黄质（violaxanthin），最终进一步在新黄质合

酶（neoxanthin synthase, NXS）的催化作用下生成新黄质（neoxanthin），其可作为合成ABA的前体物质（Jahns and Holzwarth, 2012；Neuman et al., 2014；刘昕等，2020；郑清冬等，2021）。而在另一个分支中，LCYE及LCYB将全反式番茄红素的两端催化形成了ε环和β环，生成了α-胡萝卜素，进一步羟基化后形成了叶黄素（lutein）。

石斛兰为兰科石斛属植物，具有极高的观赏价值，与卡特兰、蝴蝶兰、万代兰并列为观赏价值最高的“四大观赏洋兰”。石斛兰作为切花和盆花产品已成为花卉产业中最重要的商品兰花之一。在我国园艺栽培中，石斛兰主要分为nobile-type (春石斛)和phalaenopsis-type (秋石斛)两大类。春石斛主要作为盆栽花卉，较为耐寒，自然花期在3—5月，是重要的早春盆花；秋石斛适宜高温多湿的环境，多数品种开花高峰期在秋季，整个花序可开放长达数月。目前，秋石斛品种花色以紫红色调为主（殷涵泰等，2021），其花色素主要由花青素苷组成（李崇晖等，2013）。黄色和绿色的花色则是由类胡萝卜素和叶绿素组成的，叶黄素、玉米黄质、紫黄质及新黄质则被认为是黄花秋石斛中的主要色素（Thammasiri et al.，1986）。与花青素苷相关研究相比，关于秋石斛花中类胡萝卜素相关研究则少见报道，且其类胡萝卜素生物合成和调控过程尚未被阐明。因此，深入挖掘秋石斛类胡萝卜素色素组成、解析黄色秋石斛花朵中呈色的机制十分必要。

本研究以秋石斛品种‘金童’为材料，克隆得到*DhLCYB*、*DhLCYE*基因，对其进行生物信息学分析，并通过在不同颜色秋石斛品种发育不同阶段的基因表达特征进行研究，以期为秋石斛类胡萝卜素花色相关基因挖掘和花色改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本试验的植物材料均来自于中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所热带花卉研究中心的热带兰种质资源圃所收集、保存的资源。用于克隆基因的品种‘金童’大花芽（长度约2 cm）的cDNA来源于转录组测序样品（Luo et al., 2025）。用于研究基因表达量和类胡萝卜素成分分析的植物材料为不同花色品种的‘金公主’‘青苹果’‘绿色之星’‘三亚阳光’‘红霞’的花器官为材料（图1）。将花发育过程分为中花芽（长度1.5 ~ 2.2 cm）、大花芽（长度2 ~ 3 cm）和初开（萼片和花瓣刚张开）3个阶段。采集各发育时期的花被片（包括花瓣、萼片和唇瓣），置于液氮中速冻，–80 ℃保存用于提取RNA和类胡萝卜素代谢产物测定。



JGZ.‘金公主’；**HX**.‘红霞’；**QPG**.‘青苹果’；**LSZX**.‘绿色之星’；**SYYG**.‘三亚阳光’。**S1**.中花芽（长度1.5 ~ 2.2 cm）；**S2**.大花芽（长度2 ~ 3 cm）；**S3**.初开期（萼片和花瓣刚张开）。下同。

JGZ. *Dendrobium* ‘Arcadia Jade’; **HX**. *Dendrobium* ‘Nopporn Pink’; **QPG**. *Dendrobium* ‘Liberty White’; **LSZX**. *Dendrobium* ‘Nopporn Green Star’; **SYYG**. *Dendrobium* ‘Sonia Hiasakul’. **S1**. Mid flower bud (length 1.5–2.2 cm); **S2**. Large flower buds (length 2–3 cm); **S3**. Initial opening period (sepals and petals just opened). The same below.

图 1 秋石斛不同品种、不同阶段

Fig.1 Different varieties and stages of Den-Phals

1.2 花色测量

根据殷涵泰等（2021）的方法，利用分光色差仪（NF555 型，日本电色工业株式会社）测定花瓣及萼片在 CIELab 表色系统的明度 L^*和色相 a^*、b^*值，并计算色相角 h，测定孟赛尔颜色系统的 H（色调）、V（明度）、C（彩度）值。利用英国皇家园艺学会比色卡（RHSCC）描述初开期花瓣以及萼片颜色（表 1）。每个品种选取来自不同植株具典型花色特征的花朵 3~4 个，每朵花测定 3 次。

表 1 秋石斛不同品种初开期花色

Table1 Flower color description of *Dendrobium* hybrids during the beginning of opening

品种 Variety	花部位 Part of flower	孟赛尔表色系统（Munsell color system）			RHSCC
		H	V	C	
‘金公主’（JGZ）	P	2.66±0.26GY	7.28±0.21	7.60±0.23	144C Yellow-Green Group
	S	2.92±0.46GY	7.13±0.10	6.60±0.27	144C Yellow-Green Group
‘青苹果’（QPG）	P	2.45±0.39GY	6.69±0.10	8.34±0.31	N144B Yellow-Green Group
	S	2.10±0.51GY	7.23±0.09	6.76±0.32	N144B Yellow-Green Group
‘红霞’（HX）	P	0.27±0.12RP	3.96±0.15	12.97±0.92	N80A Purple-Violet Group
	S	0.53±0.14RP	4.93±0.24	10.15±0.83	N77B Purple Group
‘绿色之星’（LSZX）	GP	1.92±1.07YR	5.28±0.18	3.03±0.12	145B Yellow-Green Group
	GS	0.54±0.36GY	6.82±0.07	3.66±0.49	145B Yellow-Green Group
	PP	2.90±0.12RP	4.97±0.51	5.70±1.12	72A Red-Purple Group
	PS	4.80±0.43RP	4.79±0.21	5.92±0.52	70B Red-Purple Group
‘三亚阳光’（SYYG）	P	8.72±0.36RP	2.10±0.07	9.08±0.58	71A Red-Purple Group
	S	3.33±0.72RP	3.36±0.34	10.59±0.11	71A Red-Purple Group

注：**P**. 花瓣；**S**. 萼片；**GP**. ‘绿色之星’花瓣绿色部分；**GS**. ‘绿色之星’萼片绿色部分；**PP**. ‘绿色之星’花瓣紫色部分；**PS**. ‘绿色之星’萼片紫色部分。

Note: **P**. Petals; **S**. Sepals; **GP**. Green part of LSZX petal; **GS**. Green part of LSZX sepal ; **PP**. Purple part of LSZX petal; **PS**. Purple part of LSZX sepal.

1.3 总 RNA 提取与 cDNA 第一条链合成

使用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒（天根生化科技有限公司）提取样品总 RNA，用 1%琼脂糖凝胶电泳检测，RNA 样品质量符合标准后，使用反转录试剂（TOLOBIO）合成 cDNA，置于－20 ℃冰箱备用。

1.4 *LCYB*、*LCYE* 克隆及生物信息学分析

基于本研究团队秋石斛品种‘金童’转录组数据（Luo et al., 2025）筛选得到 *LCYB*、*LCYE* 基因，使用 Primer Premier 6 软件基于 CDS 序列设计特异性引物 *LCYB*-F，*LCYB*-R；*LCYE*-F，*LCYE*-R（表 2）。以 1.3 中所获得的‘金童’花芽 cDNA 第一链为模版，用 DNA 高保真酶（Vazyme）试剂说明书进行 PCR 扩增。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后回收电泳产物，并连接到 T 载上。连接产物转化到大肠杆菌 DH5α感受态，阳性菌落经 PCR 检

测后测序。序列信息已提交中国国家生物信息中心 GenBase 数据库，序列号分别为 *DhLCYB* (C_AA099485.1)、*DhLCYE* (C_AA099486.1)。

利用 NCBI 在线工具查找开放阅读框，在线网站 Expasy ProParam (https://web.expasy.org/ protparam/)预测基因编码区长度、蛋白的氨基酸序列长度、分子量、分子式、等电点等；SWISS-MODEL (https://swissmodel.exp asy.org/interactive)在线工具预测其三维结构。并通过 NCBI 的 blastp 程序对 LCYB、LCYE 进行同源性比对，再结合 NCBI Protein 数据库中部分已报道验证功能的其他物种 LCYB、LCYE 氨基酸序列，利用 MEGA11 邻接法构建系统进化树。

1.5 *DhLCYB*、*DhLCYE* 表达量分析

基于 *DhLCYB*、*DhLCYE* 的 ORF 序列，利用 Primer Premier 6 软件设计荧光定量引物，反应体系及反应条件按照试剂（2×Q3 SYBR qPCR Master mix，TOLOBIO）说明书进行。实验设置 3 个生物学重复，以β-actin 和 TUA 为内参基因（侯天泽等，2022），分析 *DhLCYB*、*DhLCYE* 以及 *PSY* 在不同花色秋石斛花发育不同阶段的表达量。采用 $2^{-\triangle Ct}$ 计算相对表达量，Tbtools-II绘制表达量热图。

表 2 克隆基因及荧光定量 PCR 分析所用引物

Table 2 Primers used for gene cloning and RT-qPCR analysis

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequences（5′-3′）	引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequences（5′-3′）
LCYB-F	AATCTTCCTTCAACAGCTTCTC	*LYCE*-F	TCTCTGCTAGACATTTTCCTCGTT
LCYB-R	CCTAATATTCTCCATCCCTCAAC	*LYCE*-R	TCCCAGAAGCAGAAAAAAGTAGC
LCYB-q-1F	GCTGCCTTATCCGCTACGACAA	*LCYE*-q-1F	CAGGAGCGGAAGCCAATGGAA
LCYB-q-1R	TTCCGCTGCTTGAGTTCAGGAC	*LCYE*-q-1R	GACCACACCCGACAACGATCAA
LCYB-q-2F	ATGGTTGAGCGGTTGAGGCATT	*LCYE*-q-2F	GGCCGTGCATATGGTCGAGTTA
LCYB-q-2R	TCTGAGGAAGCACAGGGAGAGG	*LCYE*-q-2R	TGGCAAGCCTGCAAGGAATCAT
LCYB-q-3F	ATCGTTGCGGATGCCATTGTTC	*LCYE*-q-3F	ATCGCTCGATTCGGCTTCTTCC
LCYB-q-3R	CGTCCATGCCGAAGCAGAAGA	*LCYE*-q-3R	TTCCATTGGCTTCCGCTCCTG
β-actin-q-F	GTCAGGGACATCAAGGAGAAG	*TUA*-q-F	CAAAGAAGATGCAGCCAACAAC
β-actin-q-R	TGGGCACCTAAATCTCTCAGC	T*UA*-q-R	AAGACCAGTGCAGTTGTCAGCTA

注：*LCYB* 和 *LCYE* 引物各设计了 3 对，以 3 对引物所得结果的平均值作为最终数值。

Note：Three pairs of primers were designed for *LCYB* and *LCYE*, and the average of the results obtained from the three pairs of primers was taken as the final value.

1.6 类胡萝卜素靶向代谢组学分析

秋石斛初开期的花被片（包括花瓣、唇瓣和萼片）液氮冷冻送往武汉迈维代谢生物科技股份有限公司进行类胡萝卜素靶向代谢组学分析。分析方法参考 Su 等 （2023）。依据 MWDB 数据库（武汉迈维代谢生物科技股份有限公司），依据 sMRM 对类胡萝卜素代谢物（scheduled multiple reaction monitoring）进行定性和定量分析。

2 结果与分析

2.1 基因克隆及序列分析

以秋石斛品种‘金童’cDNA 为模板，经克隆、测序得到 *LCYB* 和 *LCYE* 的全长序列（图 2）。其中，*DhLCYB* 全长为 1 719 bp，ORF 为 96~1 614 bp，编码 502 个氨基酸；*DhLCYE* 全长为 1 722 bp，ORF 为 104~1 687 bp，编码 528 个氨基酸。氨基酸序列一致性比对结果显示，DhLCYB 与同属的铁皮石斛 DcLCYB 及鼓槌石斛 DchLCYB 相似性最高，分别为 96.91 %和 96.02 %，与同科的文心兰相似性为 78.48 %。而在其他园艺作物中，与水仙 NpLCYB 氨基酸相似性最高为 71.09 %。DhLCYE 亦与同属的 DcLCYE 及 DchLCYE 氨基酸序列相似性最高，分别为 95.27 %、95.45 %；与同科的小兰屿蝴蝶兰 PeLCYE 相似性为 89.58 %。与兰科之外的园艺作物最相似的是中国水仙 NtcLCYE，为 72.71 %。除此以外，

这些同源物都包含了之前被证明是植物番茄红素环化酶特征的保守基序，如 1 个二核苷酸结合结构域（Di-nucleotide binding domain）、2 个环化酶基序（Cyclase motif）和 2 个跨膜螺旋（TM helix）(Cunningham et al., 1996)（图 3）。

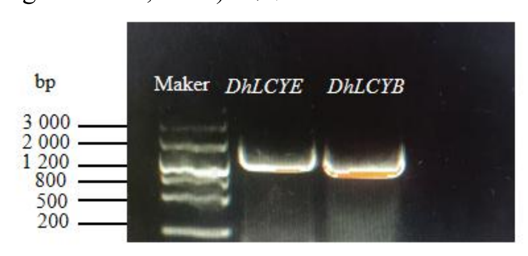
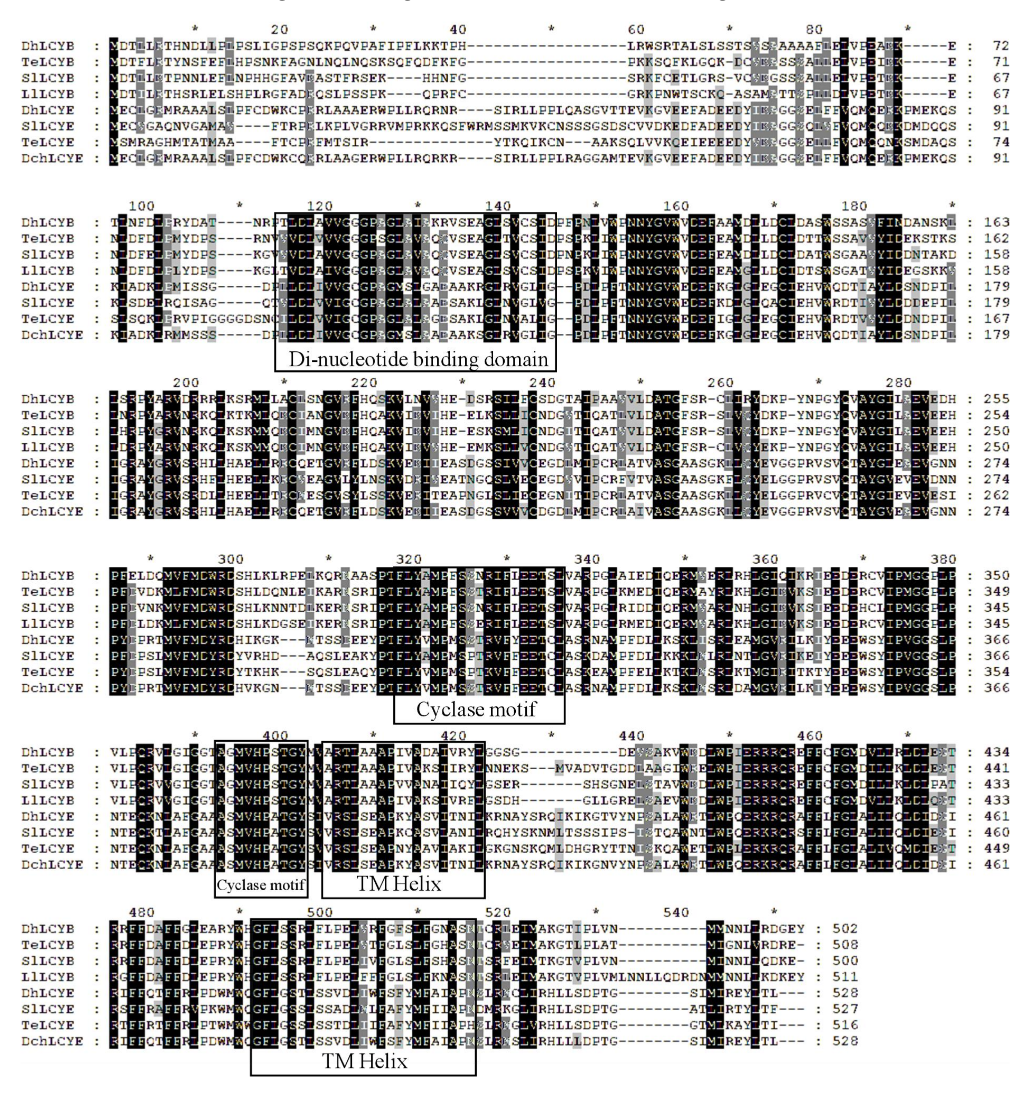


图 2 *DhLCYE* 和 *DhLCYB* 基因的克隆

Fig. 2 Cloning of *DhLCYE* and *DhLCYB* genes



Dh. 秋石斛；**Te**. 万寿菊；**Sl**. 番茄；**Ll**. 卷丹百合；**Dch**. 鼓槌石斛。

Dh. *Dendrobium* hybrids (Den-Phals); **Te**. *Tagetes erecta*; **Sl**. *Solanum lycopersicum*; **Ll**. *Lilium lancifolium*; **Dch**. *Dendrobium chrysotoxum*.

图 3 DhLCYB 和 DhLCYE 氨基酸序列与其他物种 LCYBs, LCYEs **的同源序列比对**

Fig.3 Multiple alignment of amino acid sequences of DhLCYB, DhLCYE and LCYBs, LCYEs in other species

2.2 系统进化分析

使用 NCBI 的 Blastp 程序对 DhLCYB、DhLCYE 氨基酸序列进行同源性比对，再结合已知的其他物种 LCYB、LCYE 氨基酸序列，利用 MEGA 11 邻接法构建系统进化树分析其系统进化关系。秋石斛 DhLCYB 归为 LCYB 分簇，DhLCYE 则归为 LCYE 分簇。DhLCYB 蛋白与同为石斛属的铁皮石斛 DcLCYB、鼓槌石斛 DchLCYB 聚在一类，与文心兰、深圳拟兰也有很高的相似性，而与烟草、番茄、圆叶牵牛的相似度较低。对于 LCYE，秋石斛 DhLCYE 亦与同属的 DcLCYE 和 DchLCYE 同源性最高，与小兰屿蝴蝶兰（PeLCYE）也有很相近的同源性，而与桃、梅、欧洲油菜、拟南芥则最远（图 4：A）。

2.3 DhLCYB、DhLCYE 蛋白生物信息学分析

经 Expasy ProParam 分析，DhLCYB 分子量为 56 107.85，分子式为 $C_{2526}H_{3969}N_{695}O_{708}S_{22}$，等电点（PI）为 8.07，带 55 个负电荷(Asp + Glu)和 57 个正电荷(Arg + Lys)氨基酸残基；不稳定指数为 48.99，属于不稳定蛋白。而 DhLCYE 分子量为 59 330.76，分子式为 $C_{2668}H_{4198}N_{716}O_{756}S_{29}$，等电点（PI）为 7.95，分别带 59 个负电荷(Asp + Glu)以及 61 个正电荷(Arg + Lys)氨基酸残基；不稳定指数为 45.85，亦属于不稳定蛋白。使用在线工具 Plant-mPLoc（http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/#）分析亚细胞定位显示 DhLCYB 与 DhLCYE 均定位于叶绿体。利用 SWISS-MODEL (https://swissmodel.expasy.org/interactive)在线工具预测 DhLCYB、DhLCYE 三维结构（图 4：B、C）。可见 DhLCYB、DhLCYE 在外形上高度相似，各由一个主体加上一条不规则延伸链组成。在两者的主体中，包含了较多的α-螺旋、β-折叠以及无规则延伸。

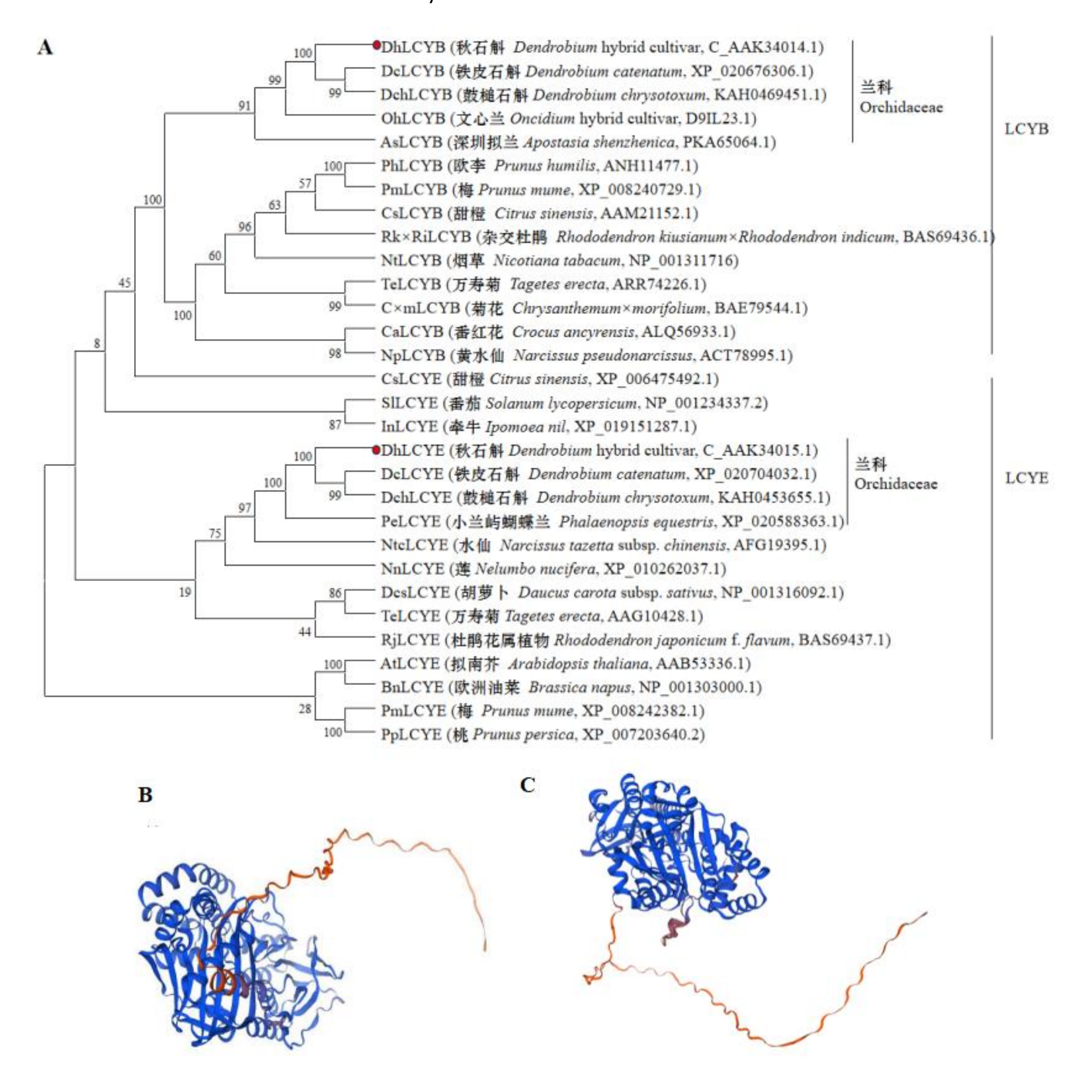


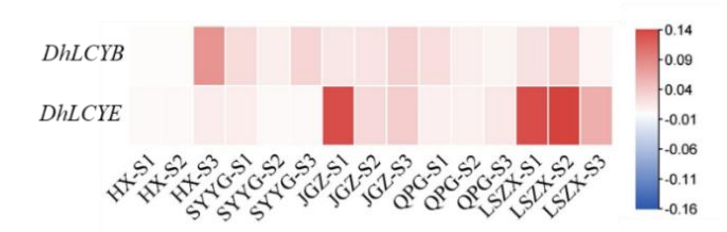
图 4 秋石斛 DhLCYB、DhLCYE 与其他物种 LCYB、LCYE 氨基酸序列系统进化树分析（A）及 DhLCYB（B）and DhLCYE（C）的 3D 结构预测

Fig. 4 Phylogenetic tree analysis（**A**） and 3D structural prediction based on the amino acid sequences of DhLCYB （**B**）and DhLCYE （**C**）from Den-Phals and LCYB and LCYE of other species

2.4 *DhLCYB* 和 *DhLCYE* 的表达特征

利用 RT-qPCR 分析了 *DhLCYB* 和 *DhLCYE* 在 5 个不同花色的品种花发育的 3 个阶段（S1、S2 和 S3）的相对表达量。*DhLCYB* 和 *DhLCYE* 在不同秋石斛开花不同阶段表达特征各异（图 5）。对于所有被测样品，*DhLCYB* 在‘红霞’S3 阶段表达量最高，在‘绿色之星’S3 阶段最低。在‘金公主’、‘红霞’的 3 个花发育阶段中，*DhLCYB* 的表达量逐渐上升；在‘三亚阳光’中则先下降后上升；在‘青苹果’花发育 3 个阶段则一直下降；在‘绿色之星’中的表达量为先上升后下降。

DhLCYE 在‘绿色之星’S2 表达量最高；在‘三亚阳光’S3、‘红霞’S1 最低；在‘红霞’3 个花发育中的表达逐步上升；在‘绿色之星’先上升后下降；在‘三亚阳光’、‘金公主’、‘青苹果’中的表达趋势为先下降后上升，变化幅度也较小。



颜色越红则表达量越高，颜色越蓝则表达量越低。

The redder the color, the higher the expression level, and the bluer the color, the lower the expression level.

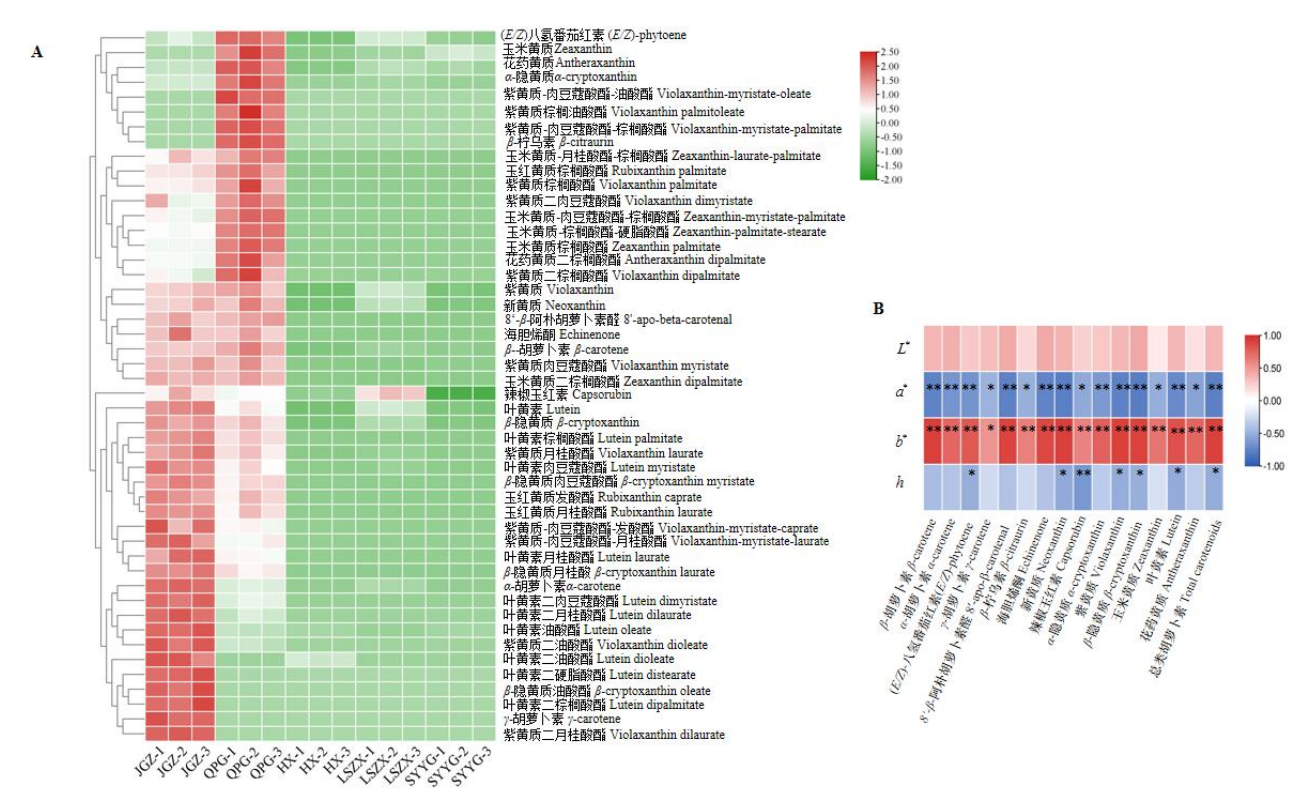
图 5 *DhLCYB*、*DhLCYE* 在不同品种秋石斛、不同花发育阶段中的表达量

Fig.5 Expression levels of *DhLCYB* and *DhLCYE* in different stages of flower development of various cultivars of Den-Phals

2.5 不同花色品种花被片中类胡萝卜素种类和含量

本研究从秋石斛花中共鉴定出 48 种类胡萝卜素。其中，胡萝卜素类 4 种，即β-胡萝卜素、α-胡萝卜素、八氢番茄红素以及γ-胡萝卜素。叶黄素类有 44 种，包括玉米黄质、β-隐黄质、紫黄质、角黄素、叶黄素、花药黄质、新黄质、8'-β-阿朴胡萝卜素醛、海胆烯酮、β-柠乌素、玉红黄质、辣椒玉红素及其酯化物。其中，‘金公主’与‘青苹果’类胡萝卜素种类最多，分别为 44 种和 43 种；‘红霞’、‘绿色之星’以及‘三亚阳光’类胡萝卜素种类最少，分别是 11、14 以及 12 种。5 个品种共有的类胡萝卜素为β-胡萝卜素、花药黄质、玉米黄质、紫黄质、新黄质以及叶黄素。紫黄质棕榈油酸脂、紫黄质-肉豆蔻酸酯-油酸脂、紫黄质-肉豆蔻酸酯-棕榈酸酯、β-柠乌素是‘青苹果’中所特有的。

叶黄素是和紫黄质是‘青苹果’、‘金公主’、‘绿色之星’和‘红霞’中含量最高的两种类胡萝卜素。叶黄素和玉米黄质是‘三亚阳光’中含量最高的两种化合物。总类胡萝卜素含量在‘金公主’中最高，为 245.89（$\mu g \cdot g^{-1}$ DW）；其次是‘青苹果’和‘绿色之星’；‘三亚阳光’以及‘红霞’的总类胡萝卜素含量都很低。‘金公主’积累的色素主要为α合成支路上的叶黄素及其衍生物。而‘青苹果’积累的色素主要为β支路上的色素，玉米黄质、花药黄质以及紫黄质及其衍生物等（图 6：A）。而色相 a^*与 15 种类胡萝卜素及其衍生物都具有显著负相关性，b^*值则为正相关（图 6：B）。



*表示相关性显著（P<0.05）；**表示相关性极显著（P <0.01）。

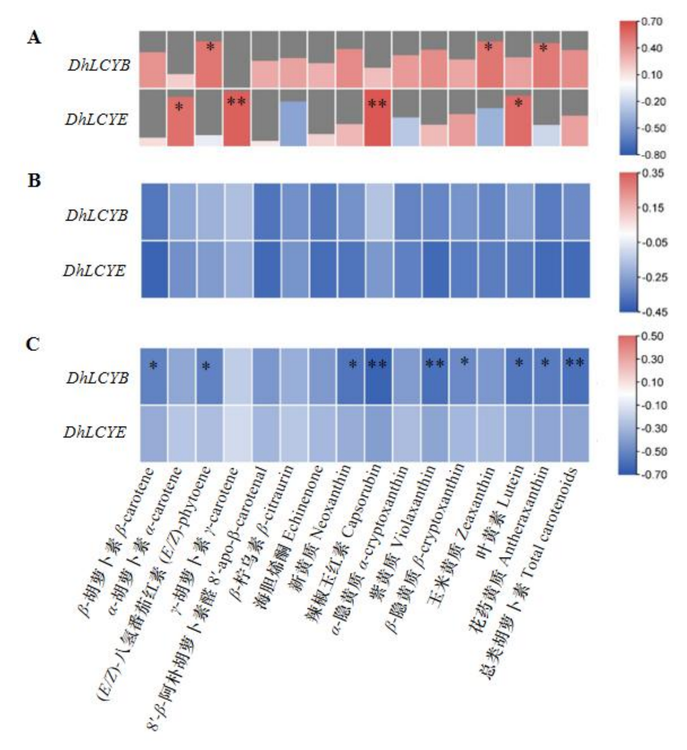
* indicates significant correlation (P<0.05); ** indicates extremely significant correlation (P<0.01).

图 6 不同品种秋石斛初开期类胡萝卜素组成和含量(A)及其与花色参数的相关性(B)

Fig. 6 Composition and content of carotenoids in different cultivars of Den-Phals during the initial flowering stage (**A**) and their correlation with color parameters (**B**)

2.6 *DhLCYB* 和 *DhLCYE* 表达量与类胡萝卜素种类和含量以及花色的相关性

将各个品种 3 个发育时期基因表达量与初开期类胡萝卜素含量进行相关性分析。在 S1 阶段中，*DhLCYB* 表达量与八氢番茄红素、玉米黄质及花药黄质 3 种类胡萝卜素具显著性相关；*DhLCYE* 与γ-类胡萝卜素和辣椒玉红素极显著相关（P<0.01），与α-类胡萝卜素、叶黄素显著性相关（图 7：A）。S2 阶段中，*DhLCYB* 和 *DhLCYE* 表达量与类胡萝卜素含量都不具显著性相关（图 7：B）。在 S3 阶段，*DhLCYB* 表达量与叶黄素、β-胡萝卜素等 6 种类胡萝卜素具显著性负相关（P <0.05）且与类胡萝卜素总含量极显著负相关（图 7：C）。



A. 中花芽时期；**B**.大花芽时期；**C**. 初开期。颜色越红则相关系数数值越高，颜色越蓝则相关系数数值越低。*表示相关性显著（*P*<0.05）；**表示相关性极显著（*P* <0.01）。

A. Mid flower bud stage; **B**. Large flower buds stage; **C**. Initial opening period stage. The redder the color, the higher the coefficient of correlation, and the bluer the color, the lower the coefficient of correlation. * indicates significant correlation (*P*<0.05); ** indicates extremely significant correlation (*P*<0.01).

图 7 *DhLCYB*、*DhLCYE* 的表达量与初开期类胡萝卜素相关性分析

Fig.7 The correlation analysis between gene expression levels of *DhLCYB* and *DhLCYE* and the content of carotenoids in the initial opening period of Den-Phals flowers

3 讨论与结论

对于类胡萝卜素生物合成或降解的调控可能是导致不同植物物种、同一植物物种花与叶等器官之间类胡萝卜素形成差异的关键因素（郝兆东等，2022）。在类胡萝卜素合成途径下游，LCYE 酶一般只能催化番茄红素的一端形成ε环生成δ-胡萝卜素，之后 LCYB 酶会在δ-胡萝卜素的另外一端催化形成β环进而生成α-胡萝卜素。因此，这一支形成的胡萝卜素及其衍生物均是一端带ε环，另一端带β环，又叫做β，ε-胡萝卜素类。在另外一支途径中，番茄红素先被 LCYB 酶催化在一端形成β环，生成γ-胡萝卜素；后又被 LCYB 酶催化在另一端形成β环，生成β-胡萝卜素。因此这一支形成的胡萝卜素及其衍生物均是两端带β环，又叫做β, β-胡萝卜素类（郝兆东等，2022）。目前，已有大量研究者对多个物种的 *LCYB*、*LCYE* 进行了功能验证。包括大白菜（李必元等，2023）、玉米（王凡予等，2023）、金花茶（王辉等，2022）、彩色马蹄莲（牟文婷，2018）、中国水仙（廖正平，2014）等。*LCYB* 和 *LCYE* 的基因表达受转录因子调控。如苜蓿的 R2R3-MYB 转录因子 WP1，直接调控花青素合成基因以及 *MtLCYB*、*MtLCYE* 的表达，通过影响花青素和类胡萝卜素的积累从而决定花瓣的呈色（Meng et al., 2019）。鹅掌楸 LtMYB305（Yang et al., 2024）和金银花 LjMADS36（Wang et al., 2024）均能直接调控 *LCYB* 表达从而促进类胡萝卜素合成。

LCYE 和 *LCYB* 基因表达情况与观赏植物花色表型密切相关。在菊花黄色品种‘Yellow

Paragon’中，黄色花瓣主要积累β, ε-胡萝卜素、叶黄素及其衍生物（Kishimoto et al.，2004; Park et al.，2015），这与黄色花瓣中 *LCYE* 基因的表达量高是一致的；而叶片中则主要含有β,β-类胡萝卜素以及高表达水平的 *LCYB* 基因（Kishimoto & Ohmiya，2006）。在不同花色的桂花品种中，*OfLCYE* 在‘金桂’花瓣中表达量最高，从而导致叶黄素的大量积累（Han et al., 2013）。本研究不同颜色的秋石斛花朵中，*DhLCYB* 和 *DhLCYE* 的表达特征各异。*DhLCYE* 总体上在黄色品种中表达量高于紫红色品种，且与叶黄素和α-胡萝卜素含量显著正相关。*DhLCYB* 在不同花色品种中表达没有明显的规律，但其在 S1 时期的表达量与花药黄质、紫黄质等 LCYB 催化分支途径的β, β-类胡萝卜素类代谢物显著正相关。据此推断秋石斛中 *DhLCYB* 在不同花色的秋石斛花色形成过程中并非关键基因，而 *DhLCYE* 可能与秋石斛不同花色品种中均以β, ε-环的叶黄素为主有关。类似地，桂花的白色、金黄色和橙色不同花色品种中 *OfLCYB* 和 *OfLCYE* 表达水平没有显著差异，表明这两个基因不是导致桂花不同花色品种间类胡萝卜素积累差异的关键基因（Qing et al., 2022）。而羊踯躅则不同，*RmLCYB* 的表达与其主要花色素β-胡萝卜素密切相关，且 *RmLCYB* 过表达可以提高类胡萝卜素含量并具有改变花色的潜力（Xiao et al., 2022）。秋石斛黄色品种中，*DhLCYE* 表达量在花开放的大花芽阶段最高。基因表达量与类胡萝卜素色素含量相关性分析显示，花开放的早期 *DhLCYB* 和 *DhLCYE* 表达与大部分类胡萝卜素含量呈显著正相关，随着花芽继续发育至开花，基因表达和色素含量相关性降低，甚至在初开期 *DhLCYB* 表达量与大部分类胡萝卜素呈显著负相关。这与桂花在初开期 *OfLCYB* 和 *OfLCYE* 表达量达到最高不同（Qing et al., 2022），秋石斛类胡萝卜素关键酶基因表达先于类胡萝卜素物质的积累。

本研究中紫色系品种所含类胡萝卜素种类与含量是最少的，黄绿色品种‘金公主’、‘青苹果’种类与含量最高，而复色品种（紫-黄绿）的‘绿色之星’居于中间，这验证了类胡萝卜素含量与种类对秋石斛黄色花色的贡献。大部分黄色秋石斛花色根据孟赛尔表色系统和英国皇家园艺学会比色卡为黄绿色，花色素组成以叶黄素为主，其次为紫黄质。同为石斛属的密花石斛和鼓槌石斛等呈淡黄色和明黄色，分别以叶黄素和玉米黄质为最主要化合物，鼓槌石斛还含有较多的叶黄素和花药黄质（黄昕蕾等，2019）。文心兰属的黄色色素为类胡萝卜素，组成与石斛兰类似（Hieber et al., 2006）。卡特兰属黄色、金色、橙色花中主要含有β-胡萝卜素、γ-胡萝卜素、番茄红素、β-玉米黄质、玉红黄质、胡萝卜醇等（Matsui et al., 1994）。桂花的橙红色花以β-胡萝卜素和α-胡萝卜素为主（Wang et al., 2018）。大量研究表明 LCYB 对于催化β-胡萝卜素、调节β-环胡萝卜素物质合成、植物果实和花朵颜色的形成具有极其重要的作用（Zhao et al., 2020）。本研究中β-胡萝卜素的含量与花色 b^*值极显著正相关，且相关系数在所有化合物中最高，因 b^*值的数值越大，表示颜色的黄色程度越高，故增加秋石斛花中的β-胡萝卜素等（即连续经 LCYB 酶催化的产物β, β-胡萝卜素类）的含量可以增加秋石斛花色的黄色程度。在本研究的几个黄色品种中，*DhLCYB* 的表达量都比较低，增加其表达量可能是提高β, β-胡萝卜素类的一种途径。综上所述，秋石斛 *DhLCYB* 和 *DhLCYE* 作为类胡萝卜素合成途径两条分支上的首个关键酶基因，对类胡萝卜素产物组成和积累进而影响石斛兰花色形成具有重要作用。

本研究从秋石斛花中克隆到了 2 个番茄红素环化酶基因，结合序列分析和表达量分析以及与类胡萝卜素类代谢产物的相关性分析，判定其为番茄红素-β环化酶基因 *DhLCYB* 和番茄红素ε-环化酶基因 *DhLCYE*。本研究为挖掘秋石斛类胡萝卜素合成途径关键基因用于花色改良提供了基因资源和育种思路。

参考文献：

CUNNINGHAM FX, POGSON B, SUN Z, et al., 1996. Functional analysis of the β- and ε-

lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation [J]. Plant Cell, 8: 1613-1626.

DAI SL, HUANG H, FU JX, et al., 2013. Advances in molecular breeding of ornamental plants [J]. Chinese Bulletin of Botany, 48(6): 589-607. [戴思兰，黄河， 付建新，等，2013. 观赏植物分子育种研究进展[J]. 植物学报，48(6): 589-607.]

HIEBER AD, MUDALIGE-JAYAWICKRAMA RG, KUEHNLE AR. 2006. Color genes in the orchid *Oncidium* Gower Ramsey: identification, expression, and potential genetic instability in an interspecific cross [J]. Planta, 223(3): 521-531.

HERMANNS AS, ZHOU XS, XU Q, et al., 2020. Carotenoid pigment accumulation in horticultural plants [J]. Horticultural Plant Journal, 6(6): 343-360.

HOU TZ, YI SS, ZHANG ZQ, et al., 2022. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR in *Phalaenopsis* type *Dendrobium* hybrid [J]. Acta Horticulturae Sinica, 49(11): 2489-2501. [侯天泽，易双双，张志群，等，2022. 秋石斛 RT-qPCR 内参基因的筛选与验证[J]. 园艺学报，49(11): 2489-2501.]

HAN Y, WANG X, CHEN W, et al., 2013. Differential expression of carotenoid-related genes determines diversified carotenoid coloration in flower petal of *Osmanthus fragrans* [J]. Tree Genetics & Genomes, 10 (2): 329-338.

HE JJ, FAN YP. 2022. Progress in composition and metabolic regulation of carotenoids related to floral color [J]. Acta Horticulturae Sinica, 49(05): 1162-1172. [何静娟，范燕萍，2022. 观赏植物花色相关的类胡萝卜素组成及代谢调控研究进展 [J]. 园艺学报，49(5): 1162-1172.]

HAO ZD, SHI JS, CHEN JH. 2022. Research progresses on regulatory mechanisms of carotenoid-mediated plant flower coloration [J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 46(6): 73-82. [郝兆东，施季森，陈金慧，2022. 类胡萝卜素介导的植物花色调控机制研究进展 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版)，46(6): 73-82.]

HUANG XL, WANG Y, ZHANG H, 2019. Analysis of carotenoids compounds and their biosynthesis pathways in flowers of three *Dendrobium* species [J]. Forest Research, 32(5): 107-113. [黄昕蕾，王雁，张辉，2019. 3 种石斛属植物类胡萝卜素成分及代谢途径分析 [J]. 林业科学研究，32(5): 107-113.]

JAHNS P, HOLZWARTH AR. 2012. The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem Ⅱ [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, 1817 (1): 182-193.

KISHIMOTO S, MAOKA TK, NAKAYAMA M, et al., 2004. Carotenoid composition in petals of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura) [J]. Phytochemistry, 65(20): 2781-2787.

KISHIMOTO S, OHMIYA A. 2006. Regulation of carotenoid biosynthesis in petals and leaves of chrysanthemum (*Chrysanthemum morifolium*) [J]. Physiologia Plantarum, 128(3): 436-447.

LI CH, QIU J, YANG GS, et al., 2013. Research progress in chemical mechanism and functional genes associated with orchid floral color [J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 33(7):45-53. [李崇晖，仇键，杨光穗，等，2013. 兰花花色化学及相关功能基因研究进展 [J]. 热带农业科学，33(7): 45-53.]

LI BY, YUE ZC, ZHAO YT, et al., 2023. Identification and functional analysis of the *BrLCYB* gene of lycopene β-cyclase from Chinese cabbage [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 35(9): 2090-2096. [李必元，岳智臣，赵彦婷，等，2023. 大白菜番茄红素β-环化酶基因 BrLCYB 的鉴定与功能分析 [J]. 浙江农业学报，35(9): 2090-2096.]

LIAO ZP. 2014. Construction of a binary plant expressionvector consisting of *LCYE* RNAi andantisense *BCH* and transformation of Chinese *Narcissus* (*Narcissus tazetta* L. var. *chinensis*) [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. [廖正平，2014. *LCYE* RNAi 与反义 *BCH* 双价植物表达载体的构建及转化中国水仙的研究 [D]. 福州：福建农林大学.]

LIU X, CHEN YZ, KIM PYOL et al., 2020. Progress on molecular mechanism and regulation of tomato fruit color formation [J]. Acta Horticulturae Sinica, 47 (9):1689-1704. [刘昕，陈韵竹，Kim Pyol，等，2020. 番茄果实颜色形成的分子机制及调控研究进展 [J]. 园艺学报，47 (9): 1689-1704.

LU CF, GAO YX, HUANG H et al., 2022. Carotenoid metabolism and regulation in plants [J]. Acta Horticulturae Sinica, 49(12): 2559-2578. [陆晨飞，高月霞，黄河，等，2022. 植物类胡萝卜素代谢及调控研究进展 [J]. 园艺学报，49(12): 2559-2578.]

LUO X, LONG Z, CHEN M et al., 2025. Targeted metabolomics- and transcriptomics-based investigation of carotenoid pigmentation in *Phalaenopsis*-Type *Dendrobium* hybrids [J]. Scientia Horticulturae, 339, 113829.

MATSUI S, 1994. Floral carotenoids in species and hybrids of the *Laeliinae* [J]. Lindleyana, 9 (4): 213-217.

MENG Y, WANG Z, WANG Y, et al., 2019. The MYB activator WHITE PETAL1 associates with Mt TT8 and Mt WD40-1 to regulate carotenoid-derived flower pigmentation in *Medicago truncatula* [J]. Plant Cell, 31 (11): 2751-2767.

NEUMAN H, GALPAZ N, CUNNINGHAM FX, et al., 2014.The tomato mutation nxd1 reveals a gene necessary for neoxanthin biosynthesis and demonstrates that violaxanthin is a sufficient precursor for abscisic acid biosynthesis [J]. The Plant Journal, 78 (1): 80-93.

MOU WT, 2018. Cloning and functional analysis of *ZeLCYB* in *Zantedeschia* hybrida [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. [牟文婷，2018. 彩色马蹄莲 *ZeLCYB* 基因的克隆与功能研究[D]. 南京：南京农业大学.]

PARK CH, CHAN SC, PARK SY, et al., 2015. Anthocyanin and carotenoid contents in diferent cultivars of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Ramat.) flower [J]. Molecules, 20(6): 11090-11102.

QING H, CHEN J, JIANG L, et al., 2022. Functional Characterization of Two Lycopene Cyclases from Sweet Osmanthus (*Osmanthus fragrans*) [J]. Scientia Horticulturae, 299: 111062.

SU W, ZHU C, FAN Z, et al., 2023. Comprehensive metabolome and transcriptome analyses demonstrate divergent anthocyanin and carotenoid accumulation in fruits of wild and cultivated loquats [J]. Frontiers in Plant Science, 14: 1285456.

THAMMASIRI K, TANG CS, YAMAMOTO HY, et al., 1986. Carotenoids and chlorophylls in yellow-flowered *Dendrobium* species [J]. Lindleyana, 1(3): 215-218.

WANG FY, HE WW, LI DJ, et al., 2023. Cloning, Expression and functional analysis of lycopene cyclase gene from maize [J]. Food Science, 44(18): 77-84. [王凡予，何伟伟，李大婧，等，2023. 玉米番茄红素环化酶基因的克隆、表达及功能分析 [J].食品科学，44(18): 77-84.]

WANG H, LIU HX, ZHOU XW, et al., 2022. Cloning and expression analysis of lycopene *β*-cyclase gene of *Camellia Nitidissima* [J]. Journal of Xinyang Normal University (Natural Science Edition), 35(3): 387-392. [王辉，刘合霞，周兴文，等，2022. 金花茶番茄红素*β*-环化酶基因的克隆及表达分析 [J]. 信阳师范学院学报(自然科学版)，35(3): 387-392.]

WANG X, KONG L, CHENG H, et al., 2024. Characterization and expression analysis of the

MADS-box gene family in *Lonicera japonica* reveals the role of LjMADS36 in flower coloration. Industrial Crops & Products, 219: 119122.

WANG Y, ZHANG C, DONG B, et al., 2018. Carotenoid accumulation and its contribution to flower coloration of *Osmanthus fragrans* [J]. Frontiers in Plant Science, 9: 1499.

XIAO Z, SU JL, LIU XQ, et al., 2022. Overexpression of *RmLCYB* from *Rhododendron molle* increases carotenoid in *Nicotiana tabacum* [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 44: 71.

YANG L, LIU H, XU J, et al., 2024. LtMYB305 transcription factor regulates the expression of *LtLCYB* gene to mediate carotenoids synthesis in *Liriodendron* petals [J]. Industrial Crops & Products, 217: 118868.

YIN HT, YIN JM, LIAO Y, et al., 2021. Phenotype classification based on flower color, pigment distribution and epidermal cell shape of *Dendrobium hybrids* [J]. Acta Horticulturae Sinica, 48(10): 1907-1920. [殷涵泰，尹俊梅，廖易，等，2021. 基于秋石斛花朵颜色、色素分布及表皮细胞形态的表型分类 [J]. 园艺学报，48(10): 1907-1920.]

ZHAO ZL, LIU Z, MAO XZ. 2020. Biotechnological advances in lycopene *β*-cyclases [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 68(43): 11895-11907.

ZHENG QD, WANG Y, et al., 2021. Research advances of genes responsible for flower colors in Orchidaceae [J]. Acta Horticulturae Sinica, 48 (10): 2057-2072. [郑清冬，王艺，等，2021. 兰科植物花色相关基因研究进展 [J]. 园艺学报，48 (10): 2057-2072.]